

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005年6月23日 (23.06.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/056035 A1

(51) 国際特許分類⁷: A61K 35/80, A23L
1/30, A61P 3/10, 43/00, C12N 9/99

BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/018370

(22) 国際出願日: 2004年12月9日 (09.12.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2003-412196
2003年12月10日 (10.12.2003) JP

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 理研ビタミン株式会社 (RIKEN VITAMIN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1018370 東京都千代田区三崎町2丁目9番18号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 船山桂 (FUNAYAMA, Katsura) [JP/JP]; 〒3510011 埼玉県朝霞市本町2丁目6-19 Saitama (JP). 加原卓 (KAHARA, Takashi) [JP/JP]; 〒2610001 千葉県千葉市美浜区幸町1丁目9-6 Chiba (JP). 田中稔 (TANAKA, Minoru) [JP/JP]; 〒1740072 東京都板橋区南常盤台2丁目6-2 Tokyo (JP). 飯塚真里子 (IZUKA, Mariko) [JP/JP]; 〒3440117 埼玉県北葛飾郡庄和町金崎1246-54 Saitama (JP). 池田克巳 (IKEDA, Katsumi) [JP/JP]; 〒6590064 兵庫県芦屋市精道町6-10-202 Hyogo (JP). 山本潤子 (YAMAMOTO, Junko) [JP/JP]; 〒6060832 京都府京都市左京区下鴨萩ヶ垣内町10-1 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 岩谷龍 (IWATANI, Ryo); 〒5300003 大阪府大阪市北区堂島2丁目1番27号 桜橋千代田ビル5階 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,

規則4.17に規定する申立て:

- AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG) の指定のための出願し及び特許を与えられる出願人の資格に関する申立て (規則4.17(ii))
- USのみのための発明者である旨の申立て (規則4.17(iv))

添付公開書類:

- 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドノート」を参照。

(54) Title: ALGA EXTRACT AND SUGAR HYDROLASE INHIBITOR CONTAINING THE SAME

(54) 発明の名称: 海藻抽出物およびそれを含む糖質加水分解酵素阻害剤

(57) Abstract: A sugar hydrolase inhibitor characterized by containing, as the active ingredient, an extract of *Ascophyllum nodosum* belonging to brown algae can be employed as a useful health food or food for specified health uses aiming at treating and preventing diabetes.

(57) 要約: 褐藻類の一種であるアスコフィラム ノドサム (*Ascophyllum nodosum*) の抽出物を有効成分とすることを特徴とする糖質加水分解酵素阻害剤は、糖尿病の治療・予防を目的とする有用な健康食品あるいは特定保健用食品として利用できる。

A1

WO 2005/056035

明 細 書

海藻抽出物およびそれを含む糖質加水分解酵素阻害剤

技術分野

[0001] 本発明は海藻抽出物、詳しくは褐藻類の一種であるアスコフィラム ノドサム (Asco phyllum nodsum) の抽出物を有効成分として含有する糖質加水分解酵素阻害剤に関する。

背景技術

[0002] 肥満および糖尿病等の疾患は、過剰カロリー摂取が主な原因となり、増加の一途をたどっている。糖尿病には、インスリン依存型糖尿病(1型糖尿病)とインスリン非依存型糖尿病(2型糖尿病)の2タイプがあるが、全体の90%は後者のタイプである。

インスリン非依存型糖尿病における食後高血糖の是正は、経口血糖降下剤やインスリンを用いても困難なことがある。そのため消化管における糖質の急激な吸収を防ぐ手段として、摂取した糖質の消化に関与する酵素の活性を阻害する物質等が用いられる。

[0003] 糖質加水分解酵素の阻害物質は、糖質加水分解酵素を特異的に阻害し、糖質の加水分解・吸収を遅延することにより、食後の血糖値の急上昇およびそれに続くインスリン値の上昇を抑制することが明らかにされている。このような糖質加水分解酵素阻害剤として、 α -アミラーゼや α -グルコシダーゼを阻害するアカルボース(商品名:グルコバイ;バイエル薬品株式会社)や、 α -グルコシダーゼを阻害するボグリボース(商品名:ベイスン;武田薬品工業株式会社)が実際に医薬品として臨床に用いられている。しかしこれらの医薬品は医師の厳密な処方が必要であり、また言うまでもなく食品には利用できない。

[0004] 糖質加水分解酵素阻害物質またはそれを添加した食品は、前記疾患の病状を改善できることから、糖質加水分解酵素に関連する代謝異常の患者に有用であり、更に日常の食生活に取り入れることにより糖尿病の予防にも適している。そのため、安全性が高く摂食可能な天然物として、海藻類(例えば、特許文献1、2、3参照。)、小麦粉(例えば、特許文献4参照。)、グアバ葉(例えば、特許文献5参照。)、クローブ(

例えば、特許文献6参照。)、食用きのこ(例えば、特許文献7参照。)、タマリンド種皮(例えば、特許文献8参照。)等由来の糖質加水分解酵素阻害物質が、これまでに提案されている。

しかし、従来の天然物由来の糖質加水分解酵素阻害物質は活性が弱く、十分満足できる程のレベルに達していない。

[0005] 一方、アスコフィラム ノドサム(*Ascophyllum nodsum*)は、褐藻類ヒバマタ目、ヒバマタ科に属する海藻であり、主にノルウェーのリアス式海岸の岩礁地帯に生育している。アスコフィラム ノドサムはアルギン酸を高濃度で含有しているためアルギン酸製造用原料として利用される外、ミネラル、ビタミン類を豊富に含んでいるため、原藻を乾燥し粉末に加工された製品が飼料あるいは肥料・土壤改良剤として広く用いられているものである。しかし、アスコフィラム ノドサムの抽出物等が、糖質加水分解酵素阻害作用を有することは知られていない。

特許文献1:特開平5-284937号公報

特許文献2:特開2000-342224号公報

特許文献3:特開2002-212095号公報

特許文献4:特開昭57-140727号公報

特許文献5:特開平7-59539号公報

特許文献6:特開平12-072682号公報

特許文献7:特開2000-063281号公報

特許文献8:特開平9-291039号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明の目的は、より活性の強い天然物由来の糖質加水分解酵素阻害剤を提供することである。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決するために銳意研究を重ねた結果、褐藻類の一種であるアスコフィラム ノドサム(*Ascophyllum nodsum*)の抽出物が強力な α -アミラーゼ阻害作用を有することを見出し、この知見に基づいて本発明を完成するに至

つた。

すなわち、本発明は、

- (1) アスコフィラム ノドサム(*Ascophyllum nodsum*)の抽出物を有効成分として含有することを特徴とする糖質加水分解酵素阻害剤、
- (2) 上記(1)記載の抽出物の精製物を有効成分として含有することを特徴とする糖質加水分解酵素阻害剤、
- (3) 飲食品である上記(1)または(2)記載の糖質加水分解酵素阻害剤、
- (4) 糖尿病の治療・予防を目的とする健康食品または特定保健用食品である上記(3)記載の糖質加水分解酵素阻害剤、
- (5) アスコフィラム ノドサム(*Ascophyllum nodsum*)の抽出物を哺乳動物に投与することを特徴とする糖質加水分解酵素の阻害方法、
- (6) アスコフィラム ノドサム(*Ascophyllum nodsum*)の抽出物を哺乳動物に投与することを特徴とする糖尿病の治療または予防方法、
- (7) 糖質加水分解酵素を阻害する医薬または飲食品を製造するためのアスコフィラム ノドサム(*Ascophyllum nodsum*)の抽出物の使用、および
- (8) 糖尿病の治療または予防のための医薬または飲食品を製造するためのアスコフィラム ノドサム(*Ascophyllum nodsum*)の抽出物の使用、

に関する。

発明の効果

[0008] 本発明に用いられるアスコフィラム ノドサムからの抽出物は、強い α -アミラーゼ阻害作用を有し、さらに α -グルコシダーゼ阻害作用も有するので、前記抽出物を含有する糖質加水分解酵素阻害剤は、従来知られている海藻由来の糖質加水分解酵素阻害物質に比べて、より効果的に糖尿病の治療・予防を行うことができる。

本発明の糖質加水分解酵素阻害剤は、糖質加水分解酵素に関連する代謝異常(例えば糖尿病等)の患者に有用であり、飲食品、特に健康食品または特定保健用食品として日常の食生活に取り入れることができる。

発明を実施するための最良の形態

[0009] 本発明において、アスコフィラム ノドサム(以下アスコフィラムと略す。)は、そのい

ずれの組織、部位も用いることができるが、好ましい組織、部位は全藻または葉茎部である。アスコフィラムからの抽出に際し、海から収穫されたアスコフィラムの全藻または葉茎部をそのまま、あるいはそれらを裁断、細断または磨細したもの、またそれらを乾燥したもの、さらに全藻または葉茎部を乾燥後に裁断、細断または粉碎したもの用いることができる。好ましくは生のアスコフィラムの全藻または葉茎部を乾燥し、粉碎したものである。乾燥は、自体公知の方法、例えば風乾、天日乾燥、凍結乾燥等いずれの方法であってもよい。

[0010] 抽出溶剤としては、水または有機溶剤、あるいはそれらの混合液が用いられる。有機溶剤としては、例えば、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、n-ブタノール、イソブタノール、sec-ブタノールもしくはtert-ブタノール等の炭素数1～4の低級アルコール、ジメチルケトン、メチルエチルケトン、アセトンもしくはメチルイソブチルケトン等のケトン類等の極性有機溶剤、または酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸ブチルもしくはジエチルエーテル等の非極性有機溶剤が挙げられる。これら極性有機溶剤と非極性有機溶剤は適宜組み合わせて用いることもできる。

これらの抽出溶剤の内、好ましくは極性有機溶剤または極性有機溶剤と水の混合液、より好ましくはメタノール、エタノールまたはアセトン、あるいはそれらと水の混合液であり、特に好ましくは、メタノール、エタノールまたはアセトンと水の混合液である。極性有機溶剤と水の混合液の混合割合は、極性有機溶剤の種類により異なるが、通常極性有機溶剤／水が約5／95～100／0(v/v)の範囲内である。例えば、抽出溶剤としてメタノール-水混合液またはエタノール-水混合液を用いる場合、その割合としては約5／95～100／0(v/v)が挙げられ、好ましくは約30／70～70／30(v/v)である。またアセトン-水混合液を用いる場合、その割合としては約5／95～100／0(v/v)が挙げられ、好ましくは約30／70～80／20(v/v)である。これらの割合は、抽出効率、抽出物量および抽出物の酵素阻害活性等を考慮して決められるのが好ましい。

[0011] 本発明において、抽出物を得るための抽出方法に制限はなく、例えば浸漬による抽出、加熱抽出、連続抽出あるいは超臨界抽出等、自体公知の方法を用いることができる。アスコフィラムと抽出溶剤との比率は、特に制限されないが、アスコフィラム乾

燥物／溶剤比が約1／100～1／2(w/v)が好ましい範囲であり、約1／10～1／5(w/v)がより好ましい範囲である。具体的には、抽出は、例えばアスコフィラムを乾燥し、粉碎した抽出原料約100gに対して抽出溶剤約200mL～10L、好ましくは約500mL～1Lを用い、静置または緩やかに攪拌しながら行われるのが好ましい。抽出温度は室温から常圧下での溶剤の沸点以下の範囲とするのが作業上便利であり、また抽出時間は抽出温度等によって異なるが、数分から約7日間の範囲であり、約30分～24時間とするのが好ましい。

[0012] 抽出操作終了後、ろ過あるいは遠心分離等自体公知の方法で固体物(抽残)が除かれ、抽出液が得られる。抽出液は自体公知の方法で濃縮され、黒一褐色油状またはペースト状に濃縮された抽出物(以下、単に濃縮物ということもある。)が得られる。また、抽出液または濃縮物は、例えば温熱乾燥、凍結乾燥等自体公知の方法で乾燥することにより、固体の抽出物とすることもできる。抽出液、濃縮物、または濃縮物を水および/または有機溶剤に溶解した溶液は、例えば限外ろ過、吸着樹脂処理、分子クロマトグラフィー、分配クロマトグラフィーあるいは液-液抽出等の方法により精製されてもよい。精製された抽出物は、精製物として本発明に用いることができる。

[0013] 本発明に係る抽出物は強い α -アミラーゼ阻害作用を有し、さらに α -D-グルコシダーゼ阻害作用を有することから糖質加水分解酵素阻害剤として有用である。なお、上記糖質加水分解酵素としては、加水分解によって糖のみを生じる単純糖質を加水分解する酵素と、糖以外の物質をも生ずる複合糖質を加水分解する酵素に分けられるが、本発明における糖質加水分解酵素とは、糖のみから成るO-グリコシル化合物を加水分解する酵素をいう。このような糖質加水分解酵素として、例えば α -アミラーゼ、 α -D-グルコシダーゼ、 β -D-グルコシダーゼ、スクラーゼ、マルターゼ、イソマルターゼ、ラクターゼまたはトレハラーゼ等が挙げられる。

[0014] 本発明の糖質加水分解酵素阻害剤は、上記抽出物または精製物をそのまま、あるいは抽出物または精製物に製薬学的に許容される添加物、あるいは食品素材、食品原料、さらに必要に応じて食品添加物等を適宜混合し、自体公知の方法で液剤、散剤、顆粒剤、錠剤、マイクロカプセル、ソフトカプセルあるいはハードカプセル等の製剤として製造されるのが好ましい。また、飲食品として、固体食品、クリーム状また

はジャム状の半流動食品、ゲル状食品、飲料等あらゆる食品形態にすることが可能である。このような飲食品としては、例えば、清涼飲料、コーヒー、紅茶、乳飲料、乳酸菌飲料、ドロップ、キャンディー、チュインガム、チョコレート、グミ、ヨーグルト、アイスクリーム、プリン、水羊羹、ゼリー菓子またはクッキー等が挙げられる。これら各種製剤または飲食品は、糖尿病の治療・予防を目的とする健康食品または特定保健用食品として有用である。

[0015] 上記製剤および飲食品の製造に用いられる添加物、食品素材、食品原料あるいは食品添加物としては、例えば賦形剤(乳糖、コーンスターチ、白糖、ブドウ糖、デンプン、結晶セルロース等)、滑沢剤(ステアリン酸マグネシウム、蔗糖脂肪酸エステル等)、崩壊剤(デンプン、カルメロースナトリウム、炭酸カルシウム等)、結合剤(デンプン糊液、ヒドロキシプロピルセルロース液、アラビアゴム液等)、乳化剤・溶解補助剤(アラビアゴム、ポリソルベート80、ポピドン等)、甘味料(白糖、果糖、単シロップ、ハチミツ等)、着色料(食用タール色素、酸化鉄等)、保存料(パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸プロピル、ソルビン酸等)、増粘剤(ヒドロキシエチルセルロース、ポリエチレングリコール、アルギン酸ナトリウム等)、酸化防止剤(亜硫酸水素ナトリウム、エデト酸ナトリウム、アスコルビン酸等)、安定化剤(チオ硫酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム等)、酸味料(レモン果汁等)、調味料(グルタミン酸ナトリウム等)または香料(ハッカ、ストロベリー香料等)などを使用することができる。

[0016] 上記各種製剤および飲食品に対する上記抽出物または精製物の添加量としては、抽出物または精製物に含まれる糖質加水分解酵素の阻害活性成分の含有量により異なり一様ではないが、抽出物(固形分換算)として、例えば約0.0001～50質量%、好ましくは約0.001～20質量%、より好ましくは約0.01～10質量%である。

[0017] これら各種製剤および飲食品を経口的に摂取する場合、上記抽出物または精製物の一日あたりの用量は、固形物に換算して、体重1kgに対して、約0.01～1000mg、好ましくは約0.1～500mg、さらに好ましくは約1～300mgの範囲である。この用量を、一日あたり、1回または数回に分けて摂取すると良い。但し、実際の用量は、目的や摂取者の状況(性別、年齢、体重、BMI等)を考慮して決められるべきである。

[0018] 以下に本発明において好ましい実施例について述べるが、本発明は以下の実施

例に限定されるものではない。

実施例 1

[0019] アスコフィラム乾燥粉末約50. 0gを精密に量り、表1の割合のエタノールー水混合液500mLを加え、緩やかに攪拌しながら室温で1時間抽出した。抽出液を遠心管に移し、遠心分離により上澄み液と沈殿物に分け、沈殿物にエタノールー水混合液500mLを加え、1回目と同様にして1時間抽出した。抽出液を1回目と同様にして上澄み液と沈殿物に分け、1回目と2回目の上澄み液を合わせて吸引ろ過し、ろ液として計約1Lの抽出液を得た。この抽出液を、ロータリーエバポレーターを用いて減圧下、約60°Cで濃縮し、次に濃縮物を凍結乾燥して黒褐色粉末状の抽出物1ー6を得た。各収量を表1に示す。

[表1]

抽出物	エタノールー水混合液 (エタノール : 水 (v/v))	収量 (質量%)
抽出物 1	10 : 90	24. 2
抽出物 2	20 : 80	24. 3
抽出物 3	30 : 70	24. 3
抽出物 4	50 : 50	22. 0
抽出物 5	70 : 30	17. 0
抽出物 6	100 : 0	2. 2

実施例 2

[0020] 実施例1で得た抽出物の α -アミラーゼ、マルターゼおよびシュクラーゼ阻害活性を測定した。

1) α -アミラーゼ阻害活性の測定

実施例1で得た抽出物を段階希釈して5、10、15、20、25ppmに調製した試料溶液各々1mLと、4質量%デンプン溶液(0. 1Mリン酸緩衝液(pH7. 0)に溶解した。)1mLをよく混合し、37°Cで5分間加温した。次に α -アミラーゼ(シグマ社製)溶液0. 02mL(4. 25units/0. 02mL)を加えてよく混合し、37°Cで60分間反応後、沸騰湯浴で10分間保ち反応を停止して反応液を得た。対照区1は、予め沸騰湯浴で10分間保ち失活させた α -アミラーゼ溶液を加えて行い、対照区2は、試料溶液の代わ

りに水を加えて行った。

試料区と対照区1は反応液を40倍に希釈し、対照区2は反応液を4倍に希釈し、得られた各希釈液0.8mLに、0.01Nヨウ素溶液(0.02Nヨウ素溶液(和光純薬工業製)を蒸留水で2倍希釈した。)0.8mLと蒸留水4mLを加えてよく攪拌して試験溶液とした。次に、蒸留水を対照とし、液層の長さ1cmで波長660nmにおける試験溶液の吸光度を測定した。

別に、1mL中にデンプン50～800μgを含む標準液0.8mLずつを用いて、上記と同様に発色させた液による吸光度値から、検量線を作成した。試験溶液の吸光度と検量線から、反応液の残存デンプン量を求め、次式により阻害率を算出した。

$$\text{分解率}(\%) = (B' - S') / B' \times 100$$

S'：試料区反応液の残存デンプン量(μg/mL)

B'：対照区1反応液の残存デンプン量(μg/mL)

$$\text{阻害率}(\%) = (C - S) / C \times 100$$

S:試料区の分解率(%)

C:対照区2の分解率(%)

[0021] 2) マルターゼ阻害活性の測定

[粗酵素溶液の調製]

ラット腸管アセトン粉末(シグマ社製)に18倍量(質量)の0.1Mマレイン酸緩衝液(pH6.0)を加えて氷冷しながらホモジナイズし、遠心分離(約0°C、3000rpm、10分間)により得た上澄み液を0.1Mマレイン酸緩衝液(pH6.0)で10倍(容量)希釈し、粗酵素溶液とした。

[阻害活性の測定]

実施例1で得た抽出物を段階希釈して0.05、0.1、0.2、0.4質量%に調製した試料溶液各々0.2mLと、2質量%マルトース溶液(0.1Mマレイン酸緩衝液(pH6.0)に溶解する。)0.2mLをよく混合し、37°Cで5分間加温した。次に粗酵素溶液0.2mLを加えてよく混合し、37°Cで60分間反応後、沸騰湯浴で10分間保ち反応を停止した。反応液を室温まで放冷後遠心分離(約20°C、3,000rpm、10分間)し、上澄み液を得た。対照区1は、予め沸騰湯浴で10分間保ち失活させた粗酵素溶液を

加えて行い、対照区2は、試料溶液の代わりに水を加えて行った。

試料区、対照区1および対照区2の上澄み液のグルコース量は、グルコースオキシダーゼ法による測定キット(グルコースCII-テストワコー;和光純薬工業製)を用いて測定し、次式により阻害率を算出した。

$$\text{阻害率}(\%) = (C - (S - B)) / C \times 100$$

S:試料区上澄み液のグルコース量(mg/100mL)

C:対照区2上澄み液のグルコース量(mg/100mL)

B:対照区1上澄み液のグルコース量(mg/100mL)

[0022] 3) シュクラーゼ阻害活性の測定

[粗酵素溶液の調製]

ラット腸管アセトン粉末(シグマ社製)に18倍量の0.1Mマレイン酸緩衝液(pH6.0)を加えて氷冷しながらホモジナイズし、遠心分離(約0°C、3000rpm、10分間)により得た上澄み液を粗酵素溶液とした。

[阻害活性の測定]

実施例1で得た抽出物を段階希釈して0.05、0.1、0.2、0.4質量%に調製した試料溶液各々0.2mLと、2質量%シュクロース溶液(0.1Mマレイン酸緩衝液(pH6.0)に溶解する。)0.2mLをよく混合し、37°Cで5分間加温した。次に粗酵素溶液0.2mLを加えてよく混合し、37°Cで60分間反応後、沸騰湯浴で10分間保ち反応を停止した。反応液を室温まで放冷後遠心分離(約20°C、3,000rpm、10分間)し、上澄み液を得た。対照区1は、予め沸騰湯浴で10分間保ち失活させた粗酵素溶液を加えて行い、対照区2は、試料溶液の代わりに水を加えて行った。

試料区、対照区1および対照区2の上澄み液のグルコース量は、グルコースオキシダーゼ法による測定キット(グルコースCII-テストワコー;和光純薬工業製)を用いて測定し、次式により阻害率を算出した。

$$\text{阻害率}(\%) = (C - (S - B)) / C \times 100$$

S:試料区上澄み液のグルコース量(mg/100mL)

C:対照区2上澄み液のグルコース量(mg/100mL)

B:対照区1上澄み液のグルコース量(mg/100mL)

[0023] 阻害活性は、各酵素活性を50%阻害するときの濃度(IC_{50})で示した。抽出物の α -アミラーゼ阻害活性、マルターゼ阻害活性およびシュクラーゼ阻害活性の結果を、表2に示す。

[表2]

抽出物	阻害活性 (IC_{50})		
	α -アミラーゼ	マルターゼ	シュクラーゼ
抽出物3	128.5	987.5	1723.7
抽出物4	170.4	1119.7	1896.5
抽出物5	173.8	1284.0	1765.3
抽出物6	42.8	723.4	923.2

(単位: μ g/mL)

表2から、前記実施例1で得た抽出物3~6は α -アミラーゼ阻害活性および α -D-グルコシダーゼ阻害活性を有し、特に α -アミラーゼ阻害活性の強いことが分かる。

実施例 3

[0024] 各種海藻の乾燥粉末約50.0gを精密に量り、エタノール-水[30:70(v/v)]混合液500mLを加え、緩やかに攪拌しながら室温で1時間抽出した。抽出液を遠心管に移し、遠心分離により上澄み液と沈殿物に分け、沈殿物にはエタノール-水[30:70(v/v)]混合液500mLを加え、1回目と同様にして1時間抽出した。抽出液を1回目と同様にして上澄み液と沈殿物に分け、1回目と2回目の上澄み液を合わせて吸引ろ過し、ろ液として計約1Lの抽出液を得た。この抽出液を、ロータリーエバボレーターを用いて減圧下、約60°Cで濃縮し、次に濃縮物を凍結乾燥して粉末状の抽出物(抽出物7、比較例1~8)を得た。

これら抽出物の α -アミラーゼ阻害活性を、前記実施例2に準じて測定した。試料溶液の濃度は10 μ g/mL、100 μ g/mL、1000 μ g/mLの3点とした。結果は表3に阻害率(%)で示す。

[表3]

	海藻の種類	阻害率 (%)		
		10 μg/mL	100 μg/mL	1000 μg/mL
抽出物 7	アスコフィラム (褐藻)	25.4	94.4	95.3
比較例 1	アナアオサ (緑藻)	0	0	0
比較例 2	モヅク (褐藻)	0	0	0
比較例 3	コンブ (褐藻)	0	8.2	95.8
比較例 4	アラメ (褐藻)	0	0	0
比較例 5	ワカメ (褐藻)	0	0	8.9
比較例 6	ホンダワラ (褐藻)	0	0	4.6
比較例 7	ヒジキ (褐藻)	0	0	0
比較例 8	ヒラクサ (紅藻)	0	0	0

表3から、アスコフィラムの抽出物は他の海藻類に比べて強い α -アミラーゼ阻害活性を有し、しかも低濃度でもその活性が発現することが分かる。

実施例 4

[0025] ラット糖負荷試験

前記実施例1で得た抽出物1、抽出物3および抽出物4を試料として、ラットを用いた糖負荷試験を行った。一晩絶食した9週齢のWistar系ラットを対照群、試料投与群それぞれ5匹ずつ用いた。ラットの尾静脈からヘパリン入り採血管に約0.5mL採血した。採血後、対照群にはデンプン1g/体重kgを、試料投与群にはデンプンとして1g/体重kg、試料として1g/体重kgになるよう混合・調製したものを、それぞれ胃ゾンデを用いて経口投与した。投与後、30、60および120分後に約0.5mL採血した。採血した血は遠心分離で血漿画分を分画して、分析に供するまで-40°Cで保存した。

血漿グルコース量は、グルコースオキシダーゼ法による測定キット(グルコースCII-テストワコー;和光純薬工業製)を用いて測定した。血漿グルコース量の経時変化を表4に示す。

[表4]

経時時間 (分)	血漿グルコース量 (mg / 100 mL) (数値は平均値±標準偏差)			
	対照群	投与群 (1)	投与群 (2)	投与群 (3)
0	117±17	120±9	119±17	118±9
30	166±11	138±14*	138±14*	144±7*
60	154±8	130±10*	136±26	145±13
120	121±15	121±2	127±12	121±6

* 対照群に対して危険率 1 % で有意差あり。

投与群 (1) : 実施例 1 の抽出物 1 を試料として投与

投与群 (2) : 実施例 1 の抽出物 3 を試料として投与

投与群 (3) : 実施例 1 の抽出物 4 を試料として投与

本発明の抽出物は、デンプン投与後30分で対照群と比較して、有意に血漿中のグルコース量の上昇を抑制することが分かる。

実施例 5

[0026] アスコフィラム乾燥粉末約800gに、エタノール-水[50:50(v/v)]混合液8Lを加え、緩やかに攪拌しながら室温で1時間抽出した。抽出液を遠心管に移し、遠心分離により上澄み液と沈殿物に分け、沈殿物にはエタノール-水混合液8Lを加え、1回目と同様にして1時間抽出した。抽出液を1回目と同様にして上澄み液と沈殿物に分け、1回目と2回目の上澄み液を合わせて吸引ろ過し、ろ液として計約16Lの抽出液を得た。この抽出液を、分画分子量1万の限外ろ過膜(製品名:FB02-VC-FUSO 181;ダイセンメンブレンシステムズ社)を用いて限外ろ過し、濃縮液量が5Lになった時点で水5Lを加えてろ過を続け、濃縮液量が再び5Lになった時点で限外ろ過を終了した。濃縮液を、ロータリーエバポレーターを用いて減圧下、約60°Cで濃縮し、次に濃縮物を凍結乾燥して黒褐色粉末状の抽出物(抽出物8)約73gを得た。

実施例 6

[0027] 乳糖50質量部、コーンスター138質量部、レモン香料1質量部および庶糖脂肪酸エステル1質量部に、上記実施例5の抽出物8を10質量部加えて混合後、打錠機を用いて打錠し、サプリメントを作製した。

実施例 7

[0028] 表5に示す配合の飲料溶液を約65°Cで10分間加熱処理し、室温まで冷却した後

滅菌容器に無菌的に充填し、りんご果汁飲料を作製した。

[表5]

成分	配合量（質量%）
果糖ブドウ糖液糖	1.4
りんご透明果汁	1.0
香料	0.2
酸味料	0.15
ビタミンC	0.03
色素	0.01
実施例5の抽出物8	1.00
水	74.61
合計	100

実施例8

[0029] 以下の手順でコーヒーゼリーを作製した。

- (1) 粉ゼラチン15gを約45mLの水に入れ、ふやかしておく。
- (2) 鍋に水600mL、インスタントコーヒー3g、グラニュー糖80gを入れ煮立たせる。グラニュー糖が溶けたら火を止め、実施例5の抽出物8約7gと(1)を加えてよく溶かす。
- (3) 荒熱を取ってブランデー約10mLを加え、冷ましてトロミが付けば内側を湿らせたゼリー型に流し込み、冷やして固める。

産業上の利用可能性

[0030] 本発明で得られるアスコフィラム ノドサムからの抽出物は、強い糖質加水分解酵素阻害作用を有するので、アスコフィラム ノドサムからの抽出物を含有する糖質加水分解酵素阻害剤は、従来知られている海藻由来の糖質加水分解酵素阻害物質に比べても、より効果的な糖尿病の治療・予防効果を得ることができる。また上記抽出物を含有する飲食品は糖尿病の治療・予防用の健康食品または特定保健用食品として有用である。

請求の範囲

- [1] アスコフィラム ノドサム(*Ascophyllum nodsum*)の抽出物を有効成分として含有することを特徴とする糖質加水分解酵素阻害剤。
- [2] 請求の範囲第1項記載の抽出物の精製物を有効成分として含有することを特徴とする糖質加水分解酵素阻害剤。
- [3] 飲食品である請求の範囲第1項または第2項記載の糖質加水分解酵素阻害剤。
- [4] 糖尿病の治療・予防を目的とする健康食品または特定保健用食品である請求の範囲第3項記載の糖質加水分解酵素阻害剤。
- [5] アスコフィラム ノドサム(*Ascophyllum nodsum*)の抽出物を哺乳動物に投与することを特徴とする糖質加水分解酵素の阻害方法。
- [6] アスコフィラム ノドサム(*Ascophyllum nodsum*)の抽出物を哺乳動物に投与することを特徴とする糖尿病の治療または予防方法。
- [7] 糖質加水分解酵素を阻害する医薬または飲食品を製造するためのアスコフィラム ノドサム(*Ascophyllum nodsum*)の抽出物の使用。
- [8] 糖尿病の治療または予防のための医薬または飲食品を製造するためのアスコフィラム ノドサム(*Ascophyllum nodsum*)の抽出物の使用。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018370

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

 Int.C1⁷ A61K35/80, A23L1/30, A61P3/10, 43/00, C12N9/99

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

 Int.C1⁷ A61K35/80, A23L1/30, A61P3/10, 43/00, C12N9/99

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 CA (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EEMBASE (STN), JICST (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2002/22140 A1 (Takara Bio Inc.), 21 March, 2002 (21.03.02), Claim 5; page 6, line 27 & AU 880400 A & EP 1327448 A1 & US 2004/29828 A1	1-4, 7, 8
A	JP 5-284937 A (Kabushiki Kaisha TAC Gijutsu Kagaku Kenkyusho), 01 November, 1993 (01.11.93), Table 1 (Family: none)	1-4, 7, 8
A	JP 2002-212095 A (Hokkaido), 31 July, 2002 (31.07.02), (Family: none)	1-4, 7, 8

 Further documents are listed in the continuation of Box C.

 See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

 Date of the actual completion of the international search
 27 December, 2004 (27.12.04)

 Date of mailing of the international search report
 18 January, 2005 (18.01.05)

 Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018370

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Hideyuki KIRIHARA et al., A News Screening Method for Glucosidase Inhibitors and Application to Algae Extracts, Fisher Science, 1994, Vol.60, No.6, pages 759 to 761, tables 2, 3	1-4, 7, 8
A	Ermakova, S.P. et al., Proteins of brown seaweeds as inhibitors of endo-1→3- β -D-glucanases of marine invertebrates, Biochemistry (Moscow, Russian Federation), 2001, Vol.66, No.2, pages 188 to 194, abstract. [On line]:STN).Chemical Abstracts, AN.135:251385	1-4, 7, 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/018370

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 5, 6
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions as set forth in claims 5 and 6 pertain to methods for treatment of the human body by therapy.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2004/018370

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 A61K35/80, A23L1/30, A61P3/10, 43/00, C12N9/99

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 A61K35/80, A23L1/30, A61P3/10, 43/00, C12N9/99

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA(STN), BIOSIS(STN), MEDLINE(STN), EEMBASE(STN), JICST(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 2002/22140 A1(タカラバイオ株式会社)2002.03.21、請求項5、 第6頁第27行&AU 880400 A&EP 1327448 A1&US 2004/29828 A1	1-4, 7, 8
A	JP 5-284937 A(株式会社ティエーシー技術科学研究所)1993.11.01, 表1(ファミリーなし)	1-4, 7, 8
A	JP 2002-212095 A(北海道)2002.07.31(ファミリーなし)	1-4, 7, 8

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 12. 2004

国際調査報告の発送日

18. 1. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

鶴見 秀紀

4C 8415

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Hideyuki Kirihsara et al, A News Screening Method for Glucosidase Inhibitors and Application to Algae Extracts, Fisher Science, 1994, Vol. 60, No. 6, pp. 759-761, Table 2, 3	1-4, 7, 8
A	Ermakova, S. P., et al, Proteins of brown seaweeds as inhibitors of endo-1→3- β -D-glucanases of marine invertebrates, Biochemistry (Moscow, Russian Federation), 2001, Vol. 66, No. 2, pp. 188-194, abstract. [on line]:STN. Chemical Abstracts, AN. 135:251385	1-4, 7, 8

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 5, 6 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲 5, 6 の発明は、人体の治療による処置方法に係るものである。

2. 請求の範囲 は、有意義な国際調査をできる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。